



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Metoder för påvisande av MRSA hos häst

Antonia Corin



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:10

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Metoder för påvisande av MRSA hos häst

Methods for detecting MRSA in horses

Antonia Corin

Handledare:

Susanna Sternberg Lewerin, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2013

Omslagsbild: Antonia Corin

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:10
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: MRSA, häst, påvisande, testmetoder, typningsmetoder, provtagning, förekomst

Key words: MRSA, horse, detection, testing methods, typing methods, sampling, prevalence

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	4
Litteraturoversikt	4
Vad är MRSA?	4
Förekomst av MRSA.....	4
Påvisande av MRSA.....	5
Odling.....	5
Typning och identifikation	6
Provtagningsställen	9
Hästar	9
Omgivning och miljö	10
Diskussion	10
Nomenklatur och typningsmetoder	10
Provtagning	11
Förekomst.....	11
Förebyggande åtgärder.....	12
Litteraturförteckning	13

SAMMANFATTNING

Meticillinresistenta *Staphylococcus aureus* är ett växande problem inom hästmedicinen och orsakar svårbehandlade infektioner världen över. Resistensen utvecklas genom att stafylokocker erhåller en gen, *mecA*, som ändrar β -laktamantibiotikas målstruktur. Idag är MRSA-utbrott vanligt i många länder, men hittills har vi i Sverige inte konstaterat mer än 20 fall på häst. Risken för att fler fall kommer att upptäckas i framtiden är dock stor på grund av import av hästar och smittspridning via människor.

Ett oerhört viktigt moment vid misstanke om MRSA-infektion är var man ska provta och hur man bör odla, typa och namnge de olika isolaten. Idag finns ingen väldefinierad standard eller några riktlinjer att följa på dessa punkter vilket orsakar problem vid jämförelser av isolat samt försvårar smittspårning. Det finns många olika odlingsmedier och typningsmetoder att tillgå, alla med sina fördelar och nackdelar. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) har i flera år varit den mest använda metoden vid typning av isolat men har mer och mer börjat ersättas av bland annat *spa*-typning och multi-locus sequence typing (MLST). En grundlig utvärdering och standardisering av de olika metoderna skulle vara av stor nytta för internationell smittspårning och isolatjämförelse samt ge kunskap om hur man på bästa sätt kan förhindra spridning.

SUMMARY

Meticillin resistant *Staphylococcus aureus* is a growing concern worldwide in equine medicine. It mostly causes wound infections that are very difficult to treat. The antibiotic resistance of the staphylococci is developed by the acquisition of a gene, *mecA*, which changes the target structure for the β -lactam antibiotics. Today MRSA outbreaks are seen regularly in many countries, but so far Sweden has only identified 20 equine cases. The risk of finding more cases in the future is high due to importation of horses and spread of infection by humans.

A critically important question when MRSA infection is suspected is where to sample and how to culture, type and name the isolates. Today there are no well-defined standard or guidelines for this, which causes problems when it comes to comparing isolates and tracing the source of infection. There are many different culture media and typing methods available, all with advantages and disadvantages. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has been the most commonly used typing method but is now increasingly being replaced by methods such as *spa*-typing and multi-locus sequence typing (MLST). A thorough evaluation and standardization of the different methods would be of great benefit to the international tracing of the infection sources, comparison of isolates and in providing information on how to effectively hinder spread of the bacteria.

INLEDNING

Staphylococcus aureus är en vanligt förekommande bakterie som koloniserar både djur och människor, ofta på nässlemhinnan och i luftvägarna men även på huden. I många fall orsakar bakterien inga problem för bäraren, men de senaste årtiondena har en dramatisk ökning av antibiotikaresistens uppmärksammats hos koagulaspositiva *S. aureus* i sjukhusmiljö. En av de resistenser som uppmärksammades redan på 1960-talet var mot β -laktamen meticillin, varpå den nya resistenta bakteriestammen gavs namnet meticillinresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Leonard & Markey, 2008; CFSPH, 2011).

MRSA spred sig lätt inom sjukhusen där sjuka och försvagade människor vistades och MRSA blev känd som en typisk nosokomial patogen. Det visade sig snabbt att resistensen inkluderade alla β -laktamer samt att resistensmekanismer mot andra antibiotikagrupper höll på att utvecklas. Sedan dess upptäckt har förekomsten, och därmed problemen, med nosokomiala MRSA-infektioner ökat drastiskt världen över. Vid slutet på 1990-talet förändrades epidemiologin och MRSA-infektioner började dyka upp i samhället istället för, som tidigare, enbart i sjukhusmiljö (Smittskyddsinstitutet, 2013).

Det är först nu på senare år som även MRSA hos djur har uppmärksammats som ett stort problem, speciellt när dess zoonotiska potential belysts. Även ur ett rent veterinärmedicinskt perspektiv är den ökande resistensförekomsten allvarlig då smittspridning mellan djur potentiellt kan ske mycket enkelt och snabbt. Speciellt inom hästmedicinen har detta orsakat oro då hästar är mycket känsliga för många alternativa antibiotika.

Syftet med min litteraturstudie är att svara på frågan hur man idag provtar, odlar och typbestämmer MRSA på häst. Jag vill även ta reda på den uppskattade förekomsten av ekvin MRSA i Sverige och vilka stammar som påvisats. Det är både viktigt och intressant att sammanfatta vilka metoder man idag använder för att effektivt fastställa MRSA-smitta då en kontinuerlig utveckling av metoder sker. De moderna metoderna med högre differentieringsförmåga ger en ny inblick i skillnaderna mellan isolat som tidigare ansetts vara identiska. De stammar som vanligtvis drabbar våra husdjur är oskiljbara eller mycket lika de stammar som drabbar människor, medan de hos häst visar större skillnader än man tidigare trott (O'Mahoney et al., 2005; Weese & van Duinkerken, 2010; CFSPH, 2011).

MATERIAL OCH METODER

Jag har sökt i Web of Knowledge med sökorden (meticillin-resistant OR methicillin-resistant OR meticillin resistant OR methicillin resistant) staphylococcus aureus. Jag begränsade sökresultaten genom att komplettera med "equine OR horse" samt "veterinar*" för att få fram de artiklar som huvudsakligen handlade om det veterinärmedicinska perspektivet och inte det zoonotiska.

Genom att läsa igenom referenslistorna hittade jag fler artiklar som var användbara och kunde bidra med viktig information till min frågeställning. Om jag inte kunde hitta en artikel i Web of Knowledge har jag istället sökt i Scopus eller PubMed.

Jag har även använt mig av Google och sökt på "MRSA hos häst", "MRSA in horses", "MRSA typing methods" och "MRSA SCCmec".

LITTERATURÖVERSIKT

Vad är MRSA?

Meticillinresistenta *Staphylococcus aureus* (MRSA) är koagulaspositiva stafylokocker som utvecklat resistens mot β -laktamantibiotika. β -laktamer, till exempel penicilliner och cefalosporiner, används i vanliga fall framgångsrikt vid behandling av stafylokockinfektioner. Resistensen utvecklas genom förvärvande av *mecA*-genen som kodar för produktionen av ett förändrat penicillinbindande protein (PBP2a) (Leonard & Markey, 2008). PBP2a är ett bakteriellt protein som har till funktion att tillverka proteoglykan till cellväggen, en funktion som är essentiell för bakteriers tillväxt och delning (CFSPH, 2011).

β -laktamantibiotika utövar sin effekt genom att binda till PBP och inhibera dess funktion, varpå bakterien inte kan tillväxa eller förnya sin cellvägg och slutligen dör. PBP2a i modifierad form har mycket låg affinitet för alla β -laktamer vilket gör att antibiotikan inte kan binda in till proteinet och utöva sin effekt. En viktig aspekt av MRSA är att det inte är ovanligt att den gensekvens som *mecA* sitter i även innehåller resistensgener mot andra typer av antibiotika. Dessa MRSA är då multiresistenta och är vanligtvis mycket svårbehandlade. (Leonard & Markey, 2008; CFSPH, 2011; IWG-SCC, 2013).

I Sverige är påvisande av MRSA hos djur anmälningsskyldigt till Länsstyrelsen och Jordbruksverket så att smittbegränsande åtgärder snabbt kan utföras (SJVFS 2012:24; saknummer K4).

Förekomst av MRSA

Studier över förekomsten av ekvin MRSA har gjorts i ett flertal länder sedan det första konstaterade fallet i Japan (Anzai et al., 1996); resultaten har visat på förekomst som geografiskt sett varierar mellan 0-12% (Weese & van Duinkerken, 2010). Postoperativa samt icke-nosokomiala sårinfektioner utgör de vanligast förekommande fallen av ekvin MRSA

(Leonard & Markey, 2008). Sepsis och ledinfektioner kan uppstå som komplikationer till tidigare nämnda diagnoser, men även metrit, pyodermi, pneumoni och asymptomatiska bärare har rapporterats (Anzai et al., 1996; Weese et al., 2006).

Smittspridning inom djursjukhus till andra patienter har påvisats ett flertal gånger och sker huvudsakligen via djurhälsopersonalens händer och via lokaler, redskap och inredning (Weese et al., 2004, 2005; Leonard & Markey, 2008; van Duijkeren et al., 2009). En annan studie indikerar att ett samband finns mellan tidigare antimikrobiell behandling och infektion med MRSA. Tidigare djursjukhusvistelse, tidigare kolonisering eller infektion med MRSA samt antalet hästar på gården bidrar också till ökad infektionsrisk (Weese et al., 2005, 2006). Detta på grund av att en tidigare antibiotikabehandling kan bana vägen för MRSA genom att undertrycka konkurrerande flora (Weese et al., 2005, 2006).

Att antalet hästar på gården utgjorde en riskfaktor spekulerade Weese et al. (2005) berodde på att storleken på verksamheten var mer omfattande med fler anställda och mer frekventa besök av människor och hästar från andra gårdar. En större verksamhet har även ökad sannolikhet att inhysa en häst som varit inskriven på klinik eller behandlats med antimikrobiella medel (Weese et al., 2005, 2006).

I Sverige har det inte utförts många studier över förekomst av MRSA, men de som gjorts indikerar mycket låg prevalens (Bergström et al., 2012, 2013). Det första fallet hos häst i Sverige var 2007 och sedan dess har 19 ytterligare fall av ekvin MRSA påvisats (SVA, 2013). En svensk undersökning belyste, från MRSA-spridningsperspektiv, befintliga brister i Universitetsdjursjukhusets lokaler och hygienrutiner varpå profylaktiska åtgärder kunde genomföras (Bergström et al., 2012).

Påvisande av MRSA

Odling

Direktutstryk på agarplatta eller anrikning i näringsbuljong är de två mest använda metoderna vid odling av MRSA. Weese et al. (2005) visade att anrikning i buljong gav betydligt större mängd isolat från nossvabbprover jämfört med direktutstryk; detta till skillnad från humanprover som inte uppvisade någon sådan differens.

Ett liknande försök visade att två olika buljonganrikningar i rad ökade mängden isolat ännu mer än vad en ensam anrikning gör. Resultatet var att den dubbla buljonganrikningen med mannitol- och Mueller-Hintonbuljong detekterade 15,7% av proverna som positiva medan den ensamma tryptonsojametoden bara detekterade 3,5% (van Duijkeren et al., 2010).

Agarplattorna som används vid utstryk varierar, men de mest använda är de som rekommenderades av Brown et al. (2005) (Tabell 1).

Tabell 1. De vanligast använda agartyperna vid odling av MRSA (Brown et al., 2005).

Agartyp	Egenskaper och användning
Mannitolsalt	Hög salthalt (7,5 – 10%) selekterar för stafylokocker. Innehåller även mannitol och fenyldrött som pH-indikator. Koagulaspositiva stafylokocker fermenterar mannitol och producerar sura biprodukter som ändrar agarns färg från rosa till gul. Koagulasnegativa stafylokocker t.ex. <i>Staphylococcus epidermidis</i> fermenterar vanligtvis inte mannitol och ger därför inte någon färgändring.
Mueller-Hinton	En vanlig agar att använda vid antibiotikakänslighetstester då den är lös i konsistensen och därmed underlättar antibiotikadiffusionen vid disk-diffusionstest. Innehåller även stärkelse vilket absorberar eventuella toxiner som kan interferera med antibiotikans effekt på bakterietillväxten.
Baird-Parker	En selektiv agar som används specifikt vid <i>S.aureus</i> -odling. Innehåller litiumklorid och tellurit för att inhibera tillväxt av annan flora samt ge <i>S.aureus</i> -kolonier en svart färg. Pyruvat och glycin tillsätts även för att selektera <i>S.aureus</i> -tillväxt.
Blodagar	Blodagarplattor finns i många varianter och används ofta vid odling av <i>S. aureus</i> då de är lätta att identifiera genom koloniernas dubbla hemolyszoner (α - och β -hemolysin). Innehåller förutom 5-10 % blod även NaCl, trypton och köttextrakt.
Kromogena agarplattor	Det finns ett flertal kromogena (färggivande) plattor som används vid MRSA-odling. De två varianterna som användes mest i referensartiklarna var Brilliance MRSA och ChromID MRSA. Vid tillväxt på Brilliance MRSA blir kolonierna blåfärgade p.g.a. fosfatasaktivitet. Innehåller bl. a. pepton, NaCl och olika antibiotika för att inhibera tillväxten av andra bakterier. ChromID MRSA gör kolonierna grönfärgade p.g.a. α -glucuronidasproduktion i närvaro av cephoxitin.

Generellt har alla agarplattor tillsatt meticillin, oxacillin, aztreonam eller ciprofloxacin för att selektera bort annan flora. Salthalten i agarplattorna är även högre (5-10%) än standard då stafylokocker tål högre salthalter än andra bakterier. Flera olika agarplattor brukar användas under en studie då det ännu inte finns något medium som säkert kan detektera alla olika MRSA-stammar (Brown et al., 2005). Varför vissa plattor väljs bort eller inkluderas framgår inte i de olika studierna.

Typning och identifikation

Typning av MRSA görs ofta både fenotypiskt och molekylärt för att erhålla så stor säkerhet som möjligt. Det finns ingen fastställd praxis för typning av MRSA, men i de refererade artiklarna användes en kombination av de metoder som rekommenderas av Brown et al. (2005). Den fenotypiska analysen inleds vanligtvis genom att konstatera förekomsten av stafylokocker. Detta genom bedömning av

- Kolonimorfologi - runda ca 2-3 mm stora gula eller vita kolonier med slät kant
- Gramfärgning - grampositiva, icke motila kocker i "klasar"
- Toxinproduktion - α - och β -toxiner lämnar hemolyszoner runt kolonierna som växer på blodagar

Vidare analys för att utesluta stafylokocker av andra arter inklusive koagulasnegativa stafylokocker (CoNS) med resistensgener inkluderar vanligtvis

- Latexagglutination - för att identifiera uttryck av PBP2a
- Koagulastest –*S. aureus*-stammar är positiva
- Antibiotikakänslighetstest (disk-diffusionsmetoden)

Som slutgiltig konfirmation används vanligtvis

- PCR-analys för förekomst av *mecA*- genen
- API-tester

Olika isolat benämns regelbundet, men långt ifrån alltid, som en kombination av MRST-typen samt SCC*mec*-typen som beskrivs nedan. Till exempel betyder namnet ”ST5-MRSA-II” att isolatet i fråga är av MRST-typ 5 och av SCC*mec*-typ II. Detta system föreslogs av Enright et al. (2002) och godkändes samma år av International Union of Microbiological Societies (IUMS) i Tokyo (<http://www.iums.org/>). Dock har systemet inte blivit fastslaget som internationell standard som bör användas vid all MRSA-benämning. Utöver detta system kan även *spa*-typ, MLVA-typ och PFGE-pulstyp analyseras och anges för ytterligare distinktion och namngivning av isolat.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

PFGE-metoden är den mest använda metoden vid typning av MRSA och har länge använts som en standardmetod, men är nu långsamt på väg att ersättas av nyare metoder (Schouls et al., 2009). Metoden fungerar genom att specificerade restriktionsenzymer klipper bakteriernas genom till segment av varierande storlekar som sedan separeras i en agarosgel med hjälp av elektriska fält som upprepat skiftar riktning. När elektroforesen är klar färgas gelen och fotograferas för att kunna analysera mönstret.

Metoden används för att jämföra olika MRSA-isolat med varandra så att smittspårning och utredning av släktskap kan utföras. Metoden har god diskriminationsförmåga men slutsatser dras från skillnader mellan isolat snarare än likheter vilket gör att användningsområdet oftast är att utesluta en viss smittväg eller smittkälla (O’Mahoney et al., 2005). PFGE-utrustning är kostsam och metoden kräver hög standardisering, är arbetskrävande och tar lång tid (Smittskyddsinstitutet, 2013).

En annan känd nackdel med metoden är det inte med säkerhet går att differentiera olika isolat från varandra vid jämförelse med andra studiers PFGE-typning. Detta på grund av att resultaten inte är mätbara, att en gemensam nomenklatur inte existerar samt att olika restriktionsenzym kan ha använts. PFGE-typning blir därför svårt att redovisa jämföra och exakt återskapa i andra laboratorier. (Enright et al., 2002; Leonard & Markey, 2008)

SCCmec-typning

Genen som kodar för methicillinresistensen (*mecA*) är en del av ett mobilt segment som kallas staphylococcal chromosomal cassette (SCC). SCC kan ibland innehålla resistensgener mot andra antibiotikagrupper; isolatet är då multiresistent och är mer svårbehandlat. (Leonard & Markey, 2008; IWG-SCC, 2013)

Utöver *mecA* finns även ett "chromosomal cassette recombinase" (*ccr*)-genkomplex vars funktion är att göra hela SCC mobilt, samt *mec*-regulatoriska gener och en "junkyard-region" som inte innehåller funktionella gener. Med hjälp av PCR förökas dessa gener upp och sekvensanalyseras, varpå nukleotidföljden av *mec*- och rekombinasgenen bestämmer vilken SCCmec-typ isolatet ska delas in i. Skillnader i junkyardregionen kan användas för att definiera undergrupper. (Leonard & Markey, 2008; IWG-SCC, 2013)

Hittills finns det elva definierade grupper av SCCmec, varav I-V är de som oftast hittas hos djur och människor. Typ I-III består av större SCC och kan därför innehålla fler resistensgener än typ IV-V som är mindre i storleken. Forskare har spekulerat om att typ IV-V på grund av sin ringa storlek lättare kan överföras till andra bakterier och därmed ge upphov till spridande av antibiotikaresistens. (Enright et al., 2002; Rice et al., 2006; IWG-SCC, 2013)

Multilocus sequence typing (MLST)

Metoden går ut på att sekvensanalysera sju "housekeeping"-gener som är essentiella för bakteriens grundfunktioner. Dessa gener är mer eller mindre konstant aktiverade och har låg mutationsbenägenhet. Allelerna i dessa loci jämförs efter sekvensering med kända alleler via en databas (<http://www.mlst.net>) och på så sätt kan varje stam identifieras och sedan tilldelas en allelprofil kallad sequence type eller ST. Metoden har god diskrimineringsförmåga och används huvudsakligen för studier av evolution på längre sikt mellan olika MRSA-stammar och internationell övervakning av hur stammarna förändras. MLST lämpar sig därför inte för regionalt smittspårningsarbete då mutationer i housekeeping-generna vanligtvis inte hunnit ske under loppet av ett ensamt utbrott. (Enright et al., 2002; Smittskyddsinstitutet, 2013)

Det var genom MLST-metoden som Enright et al. (2002) presenterade starka bevis för att MRSA uppkommit från meticillinkänsliga *Staphylococcus aureus* (MSSA) som inkorporerat SCCmec-genen vid ett flertal skilda tillfällen. Detta genom att bevisa att flera isolat av MRSA hade samma ST men att SCCmec-typen skiljde sig åt, vilket starkt tydde på att de hade gemensamt ursprung men att de vid skilda tillfällen inkorporerat olika varianter av SCCmec. Nackdelen med MLST-metoden är dess höga kostnad och att det är arbetskrävande vilket begränsar tillgängligheten av tekniken för många laboratorier (Schouls et al., 2009).

Staphylococcal protein A (spa-typning)

Protein A är ett ytermembranprotein hos stafylokocker som binder till Fc-regionen på IgG-molekyler. På detta sätt exponeras Fab-regionen vilket förhindrar opsonisering och fagocytos av bakterien. DNA-sekvensering sker av *spa*-genens X-region som är mycket varierande mellan isolat. X-regionen innehåller korta repetitiva sekvenser som efter sekvensering jämförs med en databas (<http://www.spaserver.ridom.de>). Isolatet kan därefter tilldelas en spa-typ som

namnges med ett t-nummer, exempelvis t011. Metoden är snabb, effektiv och lätt reproducerbar och kan dessutom användas för att identifiera isolat som varit odifferentierbara med PFGE eller MLST. Nackdelen är att *spa*-typning enbart riktar in sig på en ensam gen som i några stammar inte skiljer sig åt trots att de i andra genaspekter är olika (Schouls et al., 2009).

Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA)

MLVA är en relativt ny metod som baserar sig på att MRSA-genomet innehåller ett flertal loci med repeterande sekvenser. Antalet repetitioner i dessa loci varierar mellan olika stammar och med hjälp av detta kan man med hög säkerhet skilja olika isolat från varandra. Metoden kan liknas vid *spa*-typningen men istället för ett enda loci i en enda gen så väljer man ut minst fem loci från hela genomet. Vanligtvis väljer man ut åtta olika loci som man sedan tidigare vet innehåller "variable number of tandem repeats" (VNTR) som är de områden som analyseras. (Schouls et al., 2009)

Skillnaderna i antalet repetitioner används för att upptäcka epidemiologiska samband och för att analysera släktskap och ursprung. Metoden används tidigare mest för typning av *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* och *Escherichia coli* samt senare även för typning av human MRSA. MLVA-typning av MRSA från djur är fortfarande nytt men ser lovande ut, speciellt ur ett epidemiologisk perspektiv men även på grund av den relativt låga kostnaden. En databas likt den för MRST är under konstruktion så att jämförelse av isolat från olika delar av världen kommer underlättas. (Schouls et al., 2009)

Provtagningsställen

Hästar

Hästar provtas vanligtvis från näsborrarna där det visats att kolonisationen är störst (Weese & van Duinkerken, 2010; van den Eede et al., 2011) vilket ansågs bero på fuktig miljö samt att hästar undersöker sin omgivning och hälsar på varandra med nosen (Weese et al., 2006).

Olika hudområden på hästar testades också där slutsatsen blev att sannolikheten att upptäcka en MRSA-positiv häst var högst när nossvabbar kompletterades med hudsvabbsprover från endera mediala carpus, hals, manke, karled eller perineum. Komplettering med prover från kors, flank eller insida lår ökade dock inte sannolikheten. (van den Eede et al., 2011)

Bergström et al. (2013) provtog båda näsborrarna, båda mungiporna, perineum, frambenets högra karled samt tidigare infekterat sårområde (i förekommande fall) och kunde konfirmera att näsborrarna är överlägset de andra provtagningsställena, likt fynden från van den Eede et al. (2011). Dock tycktes inte sannolikheten för MRSA-fynd öka med kompletterande hudprover i denna studie (Bergström et al., 2013).

Vid provtagning i näsborrarna för man upp en steril nossvabb ca 10-12 cm och roterar den mot slemhinnan (Weese & Rousseau, 2005). Därefter förs svabben ner i ett förvaringsmedium, vanligen Amies eller Stuarts medium (van den Eede et al., 2009; van Duijkeren et al., 2010), tills anrikning eller utstryk påbörjas inom 24 timmar.

Olika nossvabbar testades och jämfördes i en studie där den ena svabben var en traditionell bomullssvabb med Stuart's medium och den andra var en nylonsvabb med Amies medium (van den Eede et al., 2011). Resultatet visade att de båda svabbarna detekterade ungefär lika många MRSA-isolat men att enbart 37,9% av de positiva proverna från bomullssvabben också var positiva från nylonsvabben. I omvänd situation var 57,9% av de positiva proverna från nylonsvabben även positiva från bomullssvabben. Detta var oväntat då nylonsvabben är en ny uppfinning som är framställd specifikt för att optimera bakterieprovtagning (van den Eede et al., 2011).

Omgivning och miljö

Bergström et al. (2012) och van Duijkeren et al. (2010) har visat att MRSA kan förekomma på redskap samt i lokaler, inklusive personalutrymmen. Speciellt handtag, krubbor, saltstenar och vattenkoppar testades och visade sig vara positiva för MRSA.

Vid en omfattande provtagning av Uppsalas Universitetsdjursjukhus lokaler och inredning mellan juli 2008 och april 2010 kunde MRSA påvisas på 10 av 92 ytor (11 %). Isolaten från de olika ytorna var identiska med isolaten från ett tidigare MRSA-utbrott på djursjukhuset vilket ansågs stärka argumentet att MRSA inte enbart sprids via människa-häst eller häst-hästkontakt. (Bergström et al., 2012). Provtagning av miljö, inredning och ytor sker lättast med hjälp av en steril trasa som fuktats med buffrat peptonvatten, stryks över provtagningsytan och sedan läggs i en stomacherpåse tillsammans med en anrikningsbuljong (van Duijkeren et al., 2010; Bergström et al., 2012). Efter inkubation stryks proverna ut på agarplattor för renodling och identifikation.

DISKUSSION

Nomenklatur och typningsmetoder

En problematik som tydliggörs av artiklarna är hur komplicerat och opraktiskt det är att varken typnings- eller nomenklaturregler verkar existera för MRSA. Detta ger svårigheter i att få överblick i ämnet då många artikelförfattare väljer att typa och namnge sina isolat helt efter egen smak; ofta efter vad som just då var det mest använda tillvägagångssättet. Detta är ett problem som många har nämnt i sina artiklar och behovet av standardisering och nomenklaturregler tas ofta upp i diskussionerna (Enright et al., 2002; Weese & van Duijkeren, 2010; Bergström et al., 2012).

Ett rekommenderat tillvägagångssätt skulle märkbart underlätta både smittspårning och smittförebyggande åtgärder vid en så potentiellt allvarlig och zoonotisk infektion. Det går inte att utföra en effektiv smittspårning vid ett MRSA-utbrott om de stammar som isolaten misstänks härstamma från inte är jämförbara. Detta på grund av att de olika

typningsmetoderna riktar in sig på vitt skilda delar av genomet. Det finns dessutom fler gruppindelningar än vad det finns typningsmetoder, då vissa författare har för vana att dela in snarlika ST-typer i så kallade klonalkomplex (CC). Andra döper sina isolat till t.ex. "Canadian-type MRSA-5", "USA500" eller "New York-type" vilket inte säger något om vilken metod de blivit typade med. (Leonard & Markey, 2008)

Det tar mycket lång tid och mycket arbete för att få reda på när isolaten i själva verket hänvisar till precis samma stam. MRSA-laboratorierna är därför i stort behov av riktlinjer att följa för att underlätta smittspårning och jämförande av isolat internationellt. Det finns redan väl utformade riktlinjer för profylaktiskt arbete med MRSA, så ett system för själva provtagningen, odlingen och namngivningen bör stå på tur (Leonard & Markey, 2008).

Provtagning

Det behövs även riktlinjer eller regelverk för var och hur man ska provta och odla MRSA. För att kunna besluta om sådana riktlinjer krävs dock först mer forskning om hur effektiva de olika medierna är på prover tagna från djur. Många av de använda medierna och metoderna är direkt tagna från humanmedicinen, vilket i vissa fall har visat sig vara suboptimalt inom hästmedicinen (Weese et al., 2005). van Duijkeren et al. (2010) utförde en intressant jämförelse mellan användandet av en respektive två anrikningsbuljonger. Sådana jämförelser är mycket viktiga för framtida odling av MRSA, men av okänd anledning användes tre olika anrikningsmedier istället för att låta en buljong vara gemensam i de två grupperna. Detta gör tyvärr att en riktig jämförelse inte kan göras på grund av möjligheten att den ensamma anrikningsbuljongen (tryptonsoja) helt enkelt var ett sämre medium.

Ett argument som alltid kommer in i diskussionen om provtagningar av djur och miljö är att det är kostsamt att ta flera prover då varje enskild svabb odlas för sig. Bergström et al. (2012) löste detta genom att poola flera av sina miljöprover. Dels för att minska kostnaden, men även för att få upp mängden eventuella MRSA i mediet så att de lätt kunde detekteras. Förfarandet är mycket smidigt och reducerar dessutom antalet prov att hålla reda på. Nackdelen vid fynd av multipla stammar från ett poolat prov kan tänkas vara att smittspårningen försvåras då man inte kan veta vilken stam som fanns i vilket prov. Bergström et al. (2013) nämner även att poolande av prover på häst inte utvärderats samt att en liknande provtagning på humansidan visade att separata prov var både känsligare och snabbare än poolning.

Förekomst

Jag skulle vilja se fler studier på förekomst av MRSA hos svenska hästar så att man kan upptäcka en eventuell ökning av antalet fall. Detta för att tidigt kunna begränsa spridning och behålla den mycket låga förekomsten av MRSA i Sverige (SVA, 2013). Import av hästar är vanligt förekommande från länder där MRSA-prevalensen är högre än i Sverige. Att det dessutom förekommer asymptomatiska bärare (Weese & Rousseau, 2005; Weese et al., 2006) ökar risken för import av MRSA, speciellt i områden med tät hästpopulation och intensiv hästverksamhet.

Hos hästar i Sverige har den dominerande stammen varit spa-typ t011 inom gruppen ST398 som främst är associerad med lantbruksdjur i Europa (SVA, 2013). Denna stam har tidigare påvisats vid hästkliniker i Europa (van den Eede et al., 2009; van Duijkeren et al., 2010). Den andra typen som funnits i Sverige är spa-typ t064 inom gruppen ST8 som även den påvisats hos hästar i Europa, men inte i samma utsträckning som t011 (van Duijkeren et al., 2010).

Förebyggande åtgärder

De flesta MRSA-infektioner hos hästar brukar läka ut av sig själv med hjälp av noggrann hygien och uppsikt (Weese & Rousseau, 2005). Antibiotika används bara i de fall då det är absolut nödvändigt (Weese & Rousseau, 2005). Dock behövs fler longitudinella studier över hur länge MRSA kvarstår hos smittade patienter och asymptomatiska bärare. Detta för att kunna få en uppskattning om t.ex. hur noggrant man måste sanera boxarna på djursjukhus efter att en häst som tidigare haft en MRSA-infektion varit inskriven. Det spelar även roll vid beslut om när det är säkert att skicka hem en tidigare smittad häst till sitt stall samt om personal behöver vidta extra hygienåtgärder.

Fler studier borde därför även göras på effektiva metoder för att bekämpa MRSA-bärarskap i hästbesättningar utan användning av antibiotika. Weese & Rousseau (2005) utförde en intressant undersökning av möjligheterna till detta och kunde visa att det var genomförbart om rätt lokaler och kontrollmetoder var tillgängliga. Man bör också skriva noggranna rutiner för handhygien och desinfektion då förekomst av MRSA ibland har hittats i personalens lunch- och omklädningsrum (van Duijkeren et al., 2010).

Obligatorisk screening borde införas vid import av hästar, speciellt då mer virulenta och multiresistenta stammar existerar som än så länge inte påvisats i Sverige. Att screena alla hästar vid inskrivning på djursjukhus är en god tanke, men skulle förmodligen inte vara genomförbart i praktiken. Kostnaderna skulle bli mycket höga, tiden för att få fram provresultat är lång, dessutom finns det på många hästkliniker inte isoleringsstall nog för de inskrivna som ännu inte blivit friförklarade. I Sverige är prevalensen av MRSA på häst fortfarande väldigt låg och därför skulle ett screeningprogram av stor omfattning innebära mycket större utgifter än vad fördelarna skulle väga upp för. Ett förslag är att begränsa provtagningen till inskrivna hästar med svårläkta sår, långdragna hudinfektioner, hosta eller ökat nosflöde.

Lösningen i lågprevalensland bör vara profylaktisk: minskad antibiotikaanvändning, noggranna handhygienrutiner för personal, möjlighet till isolering av misstänkta fall samt grundlig desinfektion av boxar och utrustning. Minskad antibiotikanvändning är en åtgärd som redan påbörjats på många djursjukhus i världen men ytterligare försiktighet vid behandling skulle behöva implementeras. Speciellt med tanke på det väldigt begränsade utbudet av antibiotika för hästar då många preparat kan vara farliga och orsaka överkänslighetsreaktioner eller kolik. Detta försvårar valet av antibiotika när väl en MRSA-infektion behöver behandlas. Om resistens utvecklats för mer än β -laktamer kan det bli mycket svårt att behandla framgångsrikt utan att riskera hästens hälsa.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Anzai, T., Kamada, M., Kanemaru, T., Sugita, S., Shimizu, A. & Higuchi, T. (1996). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from mares with metritis and its zooepidemiology. *Journal of Equine Science*, 7, 7-11.
- Bergström, K., Bengtsson, B., Nyman, A. & Grönlund-Andersson, U. (2013). Longitudinal study of horses for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* following wound infections. *Veterinary Microbiology*, 163, 388-391.
- Bergström, K., Nyman, G., Widgren, S., Johnston, C., Grönlund-Andersson, U. & Ransjö, U. (2012). Infection prevention and control interventions in the first outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in an equine hospital in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54, 14-28.
- Brown, D. F. J., Edwards, D. I., Hawkey, P. M., Morrison, D., Ridgway, G. L., Towner, K. J. & Wren, M. W. D. (2005) Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 1000-1018.
- CFSPH (The Center for Food Security and Public Health). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. [online] (2011-01-01). Tillgänglig: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/mrsa.pdf>. [2013-03-20].
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H. & Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 7687-7692.
- IWG-SCC (International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements). The general guidelines for reporting novel SCCmec/SCC elements. [online]. Tillgänglig: http://www.sccmec.org/Pages/SCC_ClassificationEN.html. [2013-03-18].
- Leonard, F. C. & Markey, B. K. (2008). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Veterinary Journal*, 175, 27-36.
- O'Mahony, R., Abbott, Y., Leonard, F. C., Markey, B. K., Quinn, P. J., Pollock, P. J., Fanning, S. & Rossney, A. S. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. *Veterinary Microbiology*, 109, 285-296.
- Rice, L. B. (2006). Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *American Journal of Infection Control*, 34, S11-S19.
- Schouls, L.M., Spalburg, E.C., van Luit, M., Huijsdens, X.W., Pluister, G.N., van Santen-Verheuevel, M. G., van der Heide, H. G. J., Grundmann, H., Heck, M. E. O. C. & de Neeling, A. J. (2009). Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spa-typing. *Public Library of Science ONE*, 4, doi:10.1371/journal.pone.0005082.
- Smittskyddsinstitutet. MRSA i samhället. [online] (2010-07-01). Tillgänglig: http://www.smittskyddsinstitutet.se/upload/Publikationer/antibiotika-och-varldhygien/MRSA_i_samhallet.pdf. [2013-03-19].
- SVA (Sveriges Veterinärmedicinska Anstalt). MRSA hos djur i Sverige. [online] (2013-01-23). Tillgänglig: <http://www.sva.se/sv/Antibiotika/Anmalningsplikt/MRSA/MRSA-hos-djur-i-Sverige>. [2013-03-11].

- van den Eede, A., Martens, A., Lipinska, U., Struelens, M., Deplano, A., Denis, O., Haesebrouck, F., Gasthuys, F. & Hermans, K. (2009). High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Veterinary Microbiology*, 133, 138-144.
- van den Eede, A., Hermans, K., van den Abeele, A., Floré, K., Dewulf, J., Vanderhaeghen, W., Crombé, F., Butaye, P., Gasthuys, F., Haesebrouck, F. & Martens, A. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on the skin of long-term hospitalised horses. *The Veterinary Journal*, 193, 408-411.
- van Duijkeren, E., Moleman, M., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M., Multem, J., Troelstra, A., Fluit, A. C., van Wamel, W. J. B., Houwers, D. J., de Neeling, A. J. & Wagenaar, J. A. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: an investigation of several outbreaks. *Veterinary Microbiology*, 141, 96-102.
- Weese, J. S. & Rousseau, J. (2005). Attempted eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation in horses on two farms. *Equine Veterinary Journal*, 37, 510-514.
- Weese, J. S. & van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 140, 418-429.
- Weese, J. S., DaCosta, T., Button, L., Goth, K., Ethier, M. & Boehnke, K. (2004). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the environment in a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18, 468-470.
- Weese, J. S., Rousseau, J., Traub-Dargatz, J. L., Willey, B. M., McGeer, A. & Low, D. E. (2005). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, 580-583.
- Weese, J. S., Rousseau, J., Willey, B. M., Archambault, M., McGeer, A. & Low, D. E. (2006). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Horses at a Veterinary Teaching Hospital: Frequency, Characterization, and Association with Clinical Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20, 182-186.